

INTERACTIONS IN VITRO ENTRE L'ARN POLYMERASE
D'ESCHERICHIA COLI ET L'ADN DU BACTERIOPHAGE T7

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences biologiques

par

Clément BORDIER

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1687 approuvée par la Faculté des sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1687

1974

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1975

INTERACTIONS IN VITRO ENTRE L'ARN POLYMERASE
D'ESCHERICHIA COLI ET L'ADN DU BACTERIOPHAGE T7

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences biologiques

par

Clément BORDIER

de

Genève

Texte condensé de la thèse No 1687 approuvée par la Faculté des sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1687

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1975

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur ordinaire A. TISSIERES, directeur de thèse, et du professeur ordinaire, M. CRIPPA (Faculté des sciences) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 décembre 1974

Le Doyen :

Jean MULLER

Thèse No. 1687



Ce travail de recherche a été présenté devant la Faculté des Sciences de l'Université de Genève en automne 1974 pour remplir, en partie, les conditions posées pour l'obtention du doctorat ès-sciences.

Ce travail a été effectué dans le groupe du professeur A. TISSIERES du Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Genève. Je tiens à remercier ici le professeur TISSIERES des conseils, de l'encouragement et du soutien scientifique et matériel qu'il m'a prodigués avec patience tout au long de cette recherche.

La collaboration de Jeannette van DILLEWIJN, Pino ROSSETTI et Jacques DUBOCHET à certaines parties de ce travail a été pour moi une expérience heureuse et profitable dont je leur suis très reconnaissant.

Dick BURGESS et Mike CHAMBERLIN ont joué un rôle central dans ma formation et dans l'orientation scientifique de cette thèse. Je tiens ici à les en remercier. J'aimerais aussi remercier le groupe du Prof. CHAMBERLIN pour son hospitalité pendant mon séjour à Berkeley en automne 1973.

Je remercie enfin le professeur Marco CRIPPA qui a bien voulu accepter d'être juré de thèse.

Ma gratitude s'adresse finalement à tous les membres du Département qui m'ont aidé au cours de ce travail, en particulier à Mesdames RUDAZ et ROUILLER qui ont toujours préparé une verrerie impeccable; Christiane ADDOR et Monique VISINI qui ont dactylographié avec patience et soin les nombreuses versions des manuscrits; Otto JENNI qui a dessiné à la perfection toutes les figures de ce travail; Gottlieb ZUMBRUNN et l'atelier qui ont fabriqué ou entretenu les appareils utilisés.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0025

CHAPITRE I

Structure des macromolécules
prenant part à la transcription

4

1. L'ARN polymérase d'E. coli 4
2. L'ADN du bactériophage T7 7
3. Carte de la transcription précoce in vivo 7
4. Carte de la transcription précoce in vitro 11
5. Le promoteur de la transcription précoce
du bactériophage T7. 12

CHAPITRE II

Les étapes de la transcription in vitro
de l'ARN du bactériophage T7 par
l'ARN polymérase d'E. coli

14

1. Sélection du site d'initiation 15
2. Initiation de la synthèse d'ARN 18
3. Elongation de la chaîne d'ARN 19
4. Terminaison de la chaîne d'ARN 20

CHAPITRE III

Les résultats expérimentaux

22

1. Sous-unités de l'ARN polymérase d'Escherichia coli
pendant la transcription in vitro 23
2. Localisation au microscope électronique des sites
de fixation de l'ARN polymérase d'Escherichia coli
dans la région du promoteur de la transcription
précoce du bactériophage T7. 25
3. Inhibition de la synthèse d'ARN résistante à la
rifampicine par des complexes rifampicine-ARN
polymérase. 27

INTRODUCTION

L'ARN polymérase joue un rôle central dans le processus d'expression de l'information génétique de la cellule. Cette enzyme a été particulièrement bien étudiée chez la bactérie Escherichia coli. C'est l'ARN polymérase qui synthétise tous les types d'ARN dont la structure primaire est déterminée par celle du chromosome de la bactérie. Cette synthèse, nommée transcription est la première étape de l'expression de l'information génétique du chromosome. C'est en général en modulant la vitesse de la transcription de ses gènes que la cellule contrôle la vitesse de synthèse des protéines qui y sont codées et la vitesse de synthèse de ses ARN stables.

Le processus de transcription implique deux niveaux d'interactions spécifiques entre l'ARN polymérase et le chromosome. Premièrement l'ARN polymérase doit catalyser la polymérisation des nucléotides selon la séquence spécifique de la matrice d'ADN. Secondement l'ARN polymérase doit reconnaître sélectivement sur le chromosome les sites d'initiation et de terminaison de la synthèse d'ARN. La vitesse des réactions d'initiation et de terminaison sur ces sites est souvent contrôlée par interaction de l'ARN polymérase avec d'autres facteurs cellulaires.

Depuis l'identification et la purification de l'ARN polymérase, l'analyse biochimique de la transcription s'est concentrée sur trois principaux domaines de recherche :

1. définition des conditions physico-chimiques permettant la reproduction in vitro du processus cellulaire de transcription

2. étude de la structure des macromolécules prenant part à la transcription

3. analyse du mécanisme des différentes étapes de la transcription.

Pendant ce travail de thèse j'ai étudié in vitro certaines interactions de l'ARN polymérase d'Escherichia coli et de l'ADN du bactériophage T7.

Nous verrons plus loin, dans les paragraphes consacrés à la carte de la transcription du bactériophage T7, que le système utilisé in vitro satisfait déjà aux exigences du point 1. mentionné ci-dessus. En effet dans ce système, entièrement défini chimiquement, l'ARN polymérase d'E. coli synthétise un ARN semblable à celui qu'elle synthétise sur l'ADN du bactériophage T7 dans la cellule infectée.

Au cours des expériences dont les résultats sont présentés dans cette thèse, j'ai approché certains problèmes compris dans les points 2 et 3 mentionnés ci-dessus. En collaboration avec Guiseppe P. Rossetti, j'ai étudié la composition en sous-unités, ou structure quaternaire, de l'ARN polymérase à différentes étapes de la transcription ainsi que la relation existant entre l'initiation de la synthèse d'ARN et le changement de structure de

l'enzyme. J'ai étudié d'autre part avec Jacques Dubochet la reconnaissance sélective des sites de fixation de l'ARN polymérase dans la région du promoteur de la transcription précoce de l'ADN de T7 et j'ai localisé ces sites, par observation au microscope électronique, sur la carte physique du chromosome. L'effet de certains inhibiteurs de la synthèse d'ARN sur la fixation sélective de l'enzyme a été analysé à l'aide de la même méthode. Enfin j'ai montré l'effet inhibiteur du complexe rifampicine-ARN polymérase sur la synthèse d'ARN catalysée pour l'ARN polymérase d'E. coli résistante à la rifampicine. Le mécanisme proposé de cette inhibition observée in vitro permettrait d'expliquer la dominance de la sensibilité à la rifampicine observée dans les bactéries heterozygotes pour les allèles rifampicine.

La suite de ce travail est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré aux données structurales connues sur l'ARN polymérase d'E. coli, sur l'ADN du bactériophage T7 et sur la carte physique de sa transcription. Le deuxième chapitre est consacré à l'analyse des étapes de la transcription in vitro de l'ADN du bactériophage T7 par l'ARN polymérase d'E. coli. Le troisième chapitre contient un résumé des résultats expérimentaux obtenus pendant ce travail de thèse. Les résultats détaillés pourront être consultés dans les publications originales (7-9).

CHAPITRE I

Structure des macromolécules prenant part
à la transcription.

1. L'ARN polymérase d'Escherichia coli

La plupart des méthodes de purification de l'ARN polymérase d'Escherichia coli (12,17) donnent un mélange de deux formes de l'enzyme (4,15). Ces deux formes sont distinguées par leur composition en sous-unités. L'enzyme complète, ou ARN polymérase holoenzyme, contient les sous-unités β' , β , σ et α dans la stoechiométrie 1 : 1 : 1 : 2 (4,13,15,80). L'enzyme privée de la sous-unité σ est nommée "core" de l'ARN polymérase (15). Les sous-unités de l'ARN polymérase peuvent être identifiées après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulphate de sodium (SDS) (13). Cette méthode a permis aussi de déterminer leurs poids moléculaires respectifs : β' , 165'000 daltons (d); β , 155'000 d; σ , 95'000 d ; α , 40'000 d (13,14).

L'ARN polymérase holoenzyme peut être dissocié en "core" et en sous-unité σ par chromatographie sur colonne de phosphocellulose (14,16). Réciproquement, l'addition de quantité saturantes de la sous-unité σ à une préparation du "core" de l'ARN polymérase permet la reconstitution de l'holoenzyme (5,14). Il existe, en solution, un équilibre entre le protomère (poids moléculaire environ 480'000 d) et le dimère de l'ARN polymérase holoenzyme.

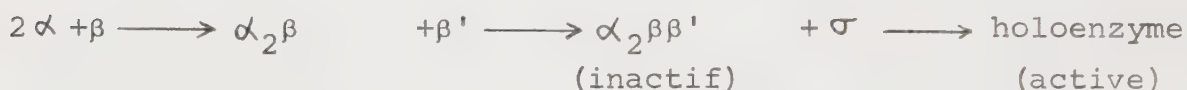
La formation du dimère est favorisée lorsque la force ionique du milieu descend en dessous de $\mu = 0.12$ (4,58). Le protomère est la forme active de l'ARN polymérase (2).

Les fonctions des différentes sous-unités de l'ARN polymérase peuvent être étudiées en dissociant partiellement l'enzyme et en analysant les réactions de la synthèse d'ARN encore catalysées par les sous-unités restantes du complexe. Cette approche a été très utile pour la compréhension de la fonction de la sous-unité sigma. Nous avons vu précédemment qu'il est possible de dissocier dans des conditions non dénaturantes l'ARN polymérase holoenzyme en "core" de l'enzyme et en sous-unité sigma (14). L'analyse de la synthèse d'ARN par le "core" de l'ARN polymérase sur une matrice d'ADN de bactériophage montre que cette synthèse a perdu pratiquement toute sélectivité et changé de cinétique d'initiation (3,19,41, 77,82). Ce résultat démontre que la sous-unité sigma est active dans le processus de sélection du site d'initiation tandis que le "core" de l'ARN polymérase possède la (ou les) sous-unité(s) responsable(s) de l'élongation de la chaîne d'ARN. La fonction de la sous-unité sigma dans le processus d'initiation sélective sera revue dans le chapitre suivant.

Cette approche est malheureusement restée d'une utilité limitée car les complexes partiels autres que le "core" de l'ARN polymérase ne semblent accomplir aucune réaction spécifique de la synthèse d'ARN (42).

Les sous-unités de l'ARN polymérase peuvent être dissociées, isolées préparativement puis réassociées en une enzyme active (34,42,43). Cette technique permet d'échanger une sous-unité particulière de l'enzyme contre la même sous-unité provenant d'une ARN polymérase modifiée chimiquement ou génétiquement. La relation existant entre une sous-unité et une fonction de l'ARN polymérase peut parfois être déduite de l'étude des propriétés de l'enzyme reconstruite. Par exemple des ARN polymérases actives peuvent être reconstituées à partir de combinaisons de sous-unités isolées d'enzymes sensibles et résistantes à la rifampicine. Seules les ARN polymérases reconstituées avec la sous-unité β isolée de l'enzyme résistante à la rifampicine seront elles-mêmes résistantes à la rifampicine (34). L'allèle "rifampicine" est donc exprimé dans la sous-unité β de l'ARN polymérase.

La reconstitution de l'ARN polymérase à partir de ses sous-unités suit le schéma suivant (44,45) :



La présence d'ADN permet l'activation du complexe $\alpha_2\beta\beta'$ en "core" de l'ARN polymérase (28).

2. L'ADN du bactériophage T7

Le chromosome du bactériophage T7 est une molécule bicaténaire d'ADN contenant 49,1% de G+C (48), dont la constante de sédimentation $S_{20,w}^0$ est $32,0 \pm 0,8$ (72) et dont le poids moléculaire se situe entre $24,8$ et $26,2 \times 10^6$ d. (27). L'analyse au microscope électronique des structures formées après dénaturation et renaturation de l'ADN montre que dans la population des molécules d'ADN la séquence des nucléotides n'est pas permutée circulairement et que les deux extrémités des molécules sont identiques sur une longueur d'environ 260 nucléotides (62). Cette absence de permutation circulaire, qui permet de localiser un site de la molécule d'ADN par rapport à ses extrémités physiques, a facilité l'établissement d'une carte détaillée de la transcription du chromosome (31,68).

3. Carte de la transcription précoce in vivo

La cinétique de la synthèse des protéines du bactériophage T7 montre qu'une classe de gènes est exprimée immédiatement après l'infection (74). Ces gènes sont groupés sur la gauche de la carte génétique, à l'extrémité du chromosome (73). L'activité du produit du gène 1, le seul de cette classe indispensable au développement du bactériophage (75), est nécessaire à l'expression des autres classes de gènes (67). Le produit du gène 1 est une nouvelle ARN polymérase (18).

La totalité de l'ARN spécifique au bactériophage T7 est synthétisé in vivo sur le brin "droit" de l'ADN, c'est-à-dire sur le brin qui est transcrit vers la droite de la carte génétique standard (78). Une classe de molécules d'ARN spécifique à T7 est synthétisée immédiatement après l'infection. Ces ARN sont les seuls synthétisés lorsque la bactérie est infectée par un bactériophage dont l'ARN polymérase (produit du gène 1) n'est pas active ou lorsque l'infection a lieu en présence d'un inhibiteur de la synthèse des protéines (67). Ces ARN, composés de cinq molécules principales, sont nommés ARN précoces et sont transcrits par l'ARN polymérase d'E. coli (53,76). La région du chromosome de T7 transcrite in vivo par l'ARN polymérase de E. coli a été localisée par étude au microscope électronique des hybrides formés entre l'ARN précoce et le brin droit de l'ADN. Cette région est située entre 1,0 et 19,8 unités physiques (39) (voir note 1.)

La région transcrite par l'ARN polymérase d'E. coli est en partie facultative à la croissance du bactériophage (75). Des mutants portant des délétions dans cette région ont été isolés et caractérisés physiquement (68). L'étude

(1) Une unité physique est une unité de longueur mesurée sur le chromosome représentant 1% de la longueur de l'ADN soit environ 378 paires de nucléotides. Les positions 0 et 100 sont identiques aux extrémités de la molécule d'ADN. La position 0 est à l'extrémité gauche de la carte génétique. Une position exprimée en unités physiques représente donc la distance séparant le point donné de l'extrémité gauche du chromosome (68).



comparative des ARN synthétisés lors d'une infection par ces mutants a permis de localiser physiquement les régions du chromosome d'où sont transcrits les cinq principaux ARN précoces (53,68,80). Il a été démontré de cette manière que chacun de ces ARN était monocistronique (68,76) (voir Fig. 1 page 10).

L'étude de l'inactivation des gènes précoces par irradiation du bactériophage aux ultraviolets a montré que ces gènes étaient d'autant moins sensibles qu'ils étaient situés plus à gauche sur la carte génétique. La relation linéaire existant entre le logarithme de la synthèse résiduelle de l'ARN ou de la protéine d'un gène donné et la position physique de la fin de ce gène montre que l'ARN polymérase d'E. coli transcrit in vivo la totalité de la région précoce de l'ADN du bactériophage T7 en une seule molécule d'ARN polycistronique initiée à un promoteur unique situé à gauche du gène O,3 (10,11). Cet ARN est ensuite coupé par la RNase III, une endonucléase spécifique de la bactérie, en cinq ARN messagers monocistroniques (26,47).



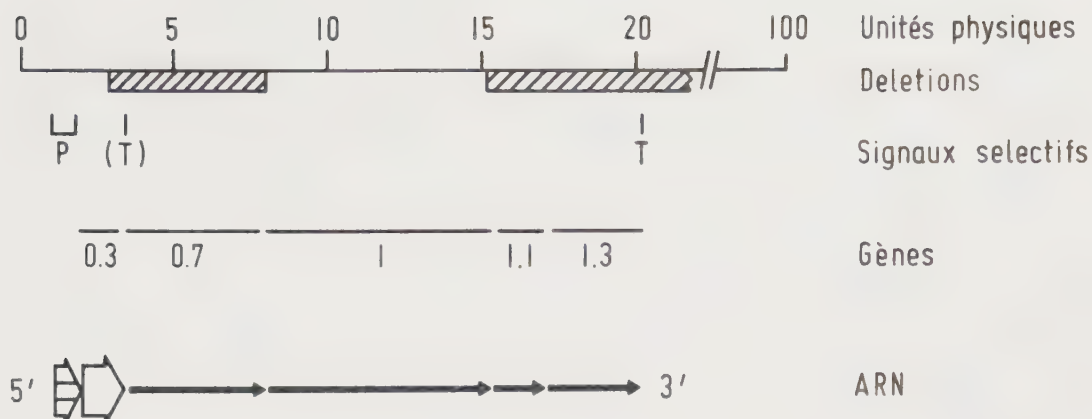


Fig. 1 : Carte physique de la transcription précoce du
bactériophage T7 in vivo

Le trait supérieur représente la molécule d'ADN. Les unités physiques indiquent les positions en % de la longueur totale de la molécule. Les zones hachurées ne sont pas indispensables à la croissance du bactériophage et peuvent être partiellement délétées (68). P et T indiquent respectivement la région du promoteur et le terminateur de la transcription précoce (39). (T) est un terminateur interne dont l'efficacité est partielle (53). Les dimensions des gènes sont déduites de celles des ARN messagers monocistroniques. La taille des ARN des gènes 0.3 et 0.7 est supérieure à la capacité de codage nécessaire à la synthèse de leur protéine (68). Les flèches représentent les molécules d'ARN messenger monocistroniques engendrées par l'attaque de l'ARN polycistronique par la RNase III (25,26). La largeur des flèches est proportionnelle au nombre de copies d'un ARN donné (53, 80).



4. Carte de la transcription précoce in vitro

La majeure partie de l'ARN synthétisé in vitro par l'ARN polymérase d'E. coli sur l'ADN de T7 est complémentaire au brin droit de la molécule d'ADN (22,23,50,54). L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre qu'une grande partie de cet ARN a un poids moléculaire homogène compris entre $2,2 \times 10^6$ et $2,7 \times 10^6$ d (21,49,51,54).

La sélectivité de l'initiation de la synthèse d'ARN in vitro par l'ARN polymérase d'E. coli a été démontrée directement par visualisation des complexes de transcription au microscope électronique (23,32,33). Le site d'initiation de la synthèse d'ARN a été localisé par cette méthode entre 1 et 2 unités physiques. La meilleure détermination directe de la position des sites d'initiation et de terminaison de la synthèse d'ARN a été obtenue par analyse au microscope électronique de complexes de transcription étalés en présence du produit du gène 32 du bactériophage T4. Les résultats obtenus par cette méthode montrent que les points d'initiation et de terminaison utilisés in vitro se trouvent respectivement à 1.42 et 19.8 unités physiques (24). Ces positions correspondent très exactement à celles des points d'initiation et de terminaison de la transcription précoce utilisés in vivo (39). La taille de l'ARN de $2,5 \times 10^6$ d est suffisante pour recouvrir l'ensemble de cette région. L'identité des régions transcrites in vitro et in vivo sur l'ADN de T7 démontre que l'ARN polymérase d'E. coli est capable



par elle-même d'initiation et de terminaison sélective.

L'ARN de $2,5 \times 10^6$ d est dégradé in vitro par la RNase III en cinq ARN correspondant aux ARN précoces monocistroniques synthétisés in vivo (25). Les extrémités des ARN produites par la digestion à la RNase III ont une séquence spécifique (63). Ces extrémités sont identiques à celles des ARN synthétisés in vivo (47).

Une analyse attentive des ARN synthétisés in vitro montre que la région précoce contient aussi des sites d'initiation et de terminaison de la synthèse d'ARN, sélectifs mais peu efficaces, situés entre les gènes (21,52,54).

5. Le promoteur de la transcription précoce du bactériophage T7

En première approximation l'ARN précoce synthétisé in vitro a un poids moléculaire unique $2,5 \times 10^6$ d. L'homogénéité apparente de la taille de cette molécule laissait penser que le promoteur de la transcription précoce ne contenait qu'un seul site d'initiation de la synthèse d'ARN. La structure de ce promoteur est cependant plus complexe. L'ARN polycistronique de la région précoce est coupé par la RNase III en cinq ARN messagers monocistronique et trois petits ARN dont la transcription ne correspond à celle d'aucun gène connu (25,26,47,53). Lorsque cet ARN est synthétisé in vitro en présence d'ATP et de GTP marqués au ^{32}P en position γ puis traité à la RNase III, seuls ces trois ARN contiennent du ^{32}P (25).



L'existence de trois ARN portant un nucléoside triphosphate à l'extrémité 5' reflète l'existence de trois points d'initiation dans la région du promoteur précoce. La même conclusion a été atteinte indépendamment en étudiant l'hétérogénéité de la taille des ARN dont la synthèse s'était terminée prématurément entre les gènes 0,3 et 0,7 (21,52,54) (voir Fig. 1). Les différences de longueur de ces ARN sont d'environ 0,2 à 0,5 unités physiques ou 80-200 nucléotides; la même distance doit donc séparer les trois points d'initiation de la synthèse d'ARN dans le promoteur de la transcription précoce (21,25,47,52,54).

Les fragments de l'ADN protégés d'une digestion nucleolytique par la fixation de l'ARN polymérase holoenzyme ont été purifiés et leur composition en bases a été analysée. Cet ADN est sensiblement plus riche en A+T (67.5%) que l'ADN total de T7 (50.9%) (48). La fixation de l'ARN polymérase protège en outre efficacement deux sites du chromosome, probablement des sites de la région du promoteur, de l'attaque par l'endonucléase spécifique de Hemophilus influenzae Hind II (1).

La fixation de l'ARN polymérase sur l'ADN de T7 a été étudiée au microscope électronique. Trois sites majeurs de fixation ont été localisés dans le promoteur de la région précoce, un quatrième site a été localisé près de l'extrémité de la répétition terminale de l'ADN (8,57). Ces travaux sont résumés dans le chapitre III.



CHAPITRE II

Les étapes de la transcription in vitro de l'ADN du
bactériophage T7 par l'ARN polymérase d'E. coli

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'ADN du bactériophage T7 est transcrit par l'ARN polymérase d'E. coli avec la même sélectivité dans un système purifié que dans la bactérie après infection. Cette propriété, complétée par la simplicité de sa carte de transcription, ont fait de l'ADN de T7 la matrice la plus communément utilisée ces dernières années pour l'étude in vitro du mécanisme de la transcription.

Le processus de transcription in vitro a été décomposé en quatre étapes principales :

1. Reconnaissance sélective du site d'initiation de la synthèse d'ARN et formation d'un complexe de fixation entre l'ARN polymérase et l'ADN.

2. Initiation de la synthèse d'ARN, définie par la formation de la première liaison phosphodiester de la future molécule d'ARN.

3. Allongement de la chaîne d'ARN par déplacement de l'enzyme sur la molécule d'ADN et par addition successive de nucléotides monophosphates complémentaires à la matrice.

4. Reconnaissance sélective du site de terminaison de la synthèse d'ARN et relâchement de la matrice d'ADN et de la molécule d'ARN synthétisée.



1. Sélection du site d'initiation

L'ARN polymérase holoenzyme d'E. coli mélangée à l'ADN du bactériophage T7 dans un rapport molaire bas ($r < 8$), dans un tampon de force ionique faible (0,05 M NaCl), à la température de 37°C, forme un complexe sélectif avec l'ADN dans la région du promoteur de la transcription précoce (7,8,19,36). Les propriétés de ce complex et les conditions influençant sa formation ont été étudiées en détail.

Dans les conditions énumérées ci-dessus, l'ARN polymérase forme avec l'ADN un complexe de fixation très stable dont la demi-vie est supérieure à 30 heures (36,38). Les molécules d'enzyme engagées dans un tel complexe sont peu sensibles à une inactivation par des polyanions tels que l'héparine et le poly (rI) (35,65) et sont capables d'initier rapidement une synthèse d'ARN spécifique lorsque les quatre nucléosides triphosphates sont rajoutés au mélange de réaction (19,35,22). Ces observations suggèrent que le complexe de fixation est formé sur, ou très près, du point spécifique d'initiation de la synthèse d'ARN. Cette hypothèse a été directement démontrée par la visualisation au microscope électronique des complexes de fixation formés entre l'ADN et l'ARN polymérase (v. Chap. III, Résultats expérimentaux et 8, 57). L'inhibition de la transcription sélective par un complexe ARN polymérase-rifampicine fixé sur l'ADN confirme d'autre part que la formation du complexe de



fixation est une étape nécessaire de la synthèse d'ARN v. Chap. III, Résultats expérimentaux et 7).

Lorsque les complexes de fixation sont formés avec un large excès d'ARN polymérase, au moins 90 molécules d'enzyme peuvent être retrouvées fixées à une molécule d'ADN. Dans ce cas, la majorité des enzymes sont fixées sans spécificité apparente sur tout le chromosome (59). Ces enzymes forment avec l'ADN des complexes beaucoup moins stables dont la demi-vie semble être comprise entre 1 et 100 millisecondes (20).

Lorsqu'une faible quantité d'ARN polymérase ($r < 8$) est mélangée à l'ADN à 25°C, il faut entre 15 et 20 secondes pour que la moitié des molécules d'enzyme aient formé un complexe stable sur les sites de fixation sélectifs (37). La vitesse de cette réaction est indépendante de la concentration d'ADN et semble être limitée par la vitesse de dissociation des complexes formés entre l'ARN polymérase et les sites non spécifiques de l'ADN (37).

Un modèle décrivant la formation du complexe de fixation stable et sélectif a été proposé récemment (20).

L'ARN polymérase forme d'abord une série de complexes de fixation instables avec les sites non spécifiques des molécules d'ADN. Quand l'ARN polymérase rencontre par hasard un promoteur, elle reconnaît le site de fixation et forme un complexe dans lequel l'ADN conserve sa forme hélicale (complexe fermé). Ce complexe est en équilibre avec une autre forme de complexe dans lequel les brins de l'ADN ont été séparés pour permettre un accès direct



aux bases de la matrice (complexe ouvert). Le complexe ouvert est capable d'initier la synthèse d'ARN. L'inhibition de la synthèse d'ARN provoquée par une haute concentration de sel ($> 0.2 \text{ M Na}^+$ ou K^+) ou par une basse température de réaction ($T < 20^\circ\text{C}$) viendrait du déplacement en faveur du complexe "fermé" de l'équilibre existant entre ces deux formes de complexe. La vitesse d'initiation dépendra essentiellement de la concentration de complexe "ouvert" et de la concentration de nucléoside triphosphates.

La dissociation des complexes non spécifiques formés entre le "core" de l'ARN polymérase et l'ADN est entre 10^4 et 10^6 fois moins rapide que celle des complexes formés par l'ARN polymérase holoenzyme (36). Ce peu d'activité dans la réaction limitant la vitesse d'initiation empêche le "core" de l'ARN polymérase de localiser les sites de fixation spécifique et d'initier efficacement la synthèse d'ARN. La sous-unité σ semble rendre instable la fixation non spécifique de l'enzyme sur l'ADN et par conséquent augmenter la vitesse de formation du complexe sélectif de fixation (36,55). A côté de cette fonction il n'est pas exclu que la sous-unité σ joue un rôle dans la stabilisation du complexe "ouvert" sur le promoteur. L'affinité généralisée du "core" de l'ARN polymérase pour toutes les séquences de l'ADN pourrait servir à stabiliser le complexe d'élongation de la chaîne d'ARN.



2. Initiation de la synthèse d'ARN

Lors de la réaction d'initiation l'ARN polymérase, fixée sur le promoteur en un complexe "ouvert" avec l'ADN, catalyse la liaison de deux ribonucléosides triphosphates avec élimination de pyrophosphate. Le dinucléoside tétraphosphate synthétisé à la structure $\text{ppp}_G^A \text{pX}_{\text{OH}}$ et reste lié en un complexe ternaire à l'ADN et à l'ARN polymérase.

Le nucléotide incorporé à l'extrémité 5' des ARN synthétisés in vitro sur l'ADN du bactériophage T7 peut être ATP ou GTP (70). Des mesures d'incorporation de nucléotides marqués au ^{32}P en position γ montrent que l'ATP est utilisé 2 à 3 fois plus souvent que le GTP (19,25,40,54). Nous avons vu dans le Chapitre précédent que le promoteur de la transcription précoce contient trois sites d'initiation séparés par 80-200 nucléotides. Les nucléosides triphosphates 5' terminaux des ARN initiés sur ces sites sont respectivement ATP, GTP, ATP (25,54). La séquence de l'oligonucléotide 5' terminal de l'ARN initié le plus à gauche sur la carte physique du chromosome est pppApUpCpGp (40,47).

En présence de hautes concentrations de nucléosides triphosphates (400 μM), la vitesse de la réaction d'initiation est près de 100 fois plus rapide ($t_{\frac{1}{2}}$: 0.2 sec) que celle de la fixation sélective de l'ARN polymérase sur le promoteur ($t_{\frac{1}{2}}$: 15-20 sec). A de très basses concentrations de nucléosides triphosphates ($< 10 \mu\text{M}$)



la vitesse de la réaction d'initiation devient limitante. L'addition de dinucléotides monophosphates stimule la synthèse d'ARN dans ces conditions car elle permet d'éviter la réaction d'initiation proprement dite, la première liaison phosphodiester formée par l'enzyme étant déjà une liaison d'élongation de la chaîne d'ARN (52).

La composition en sous unités de l'ARN polymérase pendant la réaction d'initiation est identique à celle de l'holoenzyme (v. Chap. III Résultats expérimentaux et 9, 46).

3. Elongation de la chaîne d'ARN

Lors de l'élongation de la chaîne d'ARN les nucléosides monophosphates sont additionnés successivement, en une séquence dictée par la structure de l'ADN, à l'extrémité 3' de la chaîne naissante d'ARN. La vitesse d'élongation mesurée in vitro sur l'ADN de T7 à une concentration de 400 μ M de nucléosides triphosphates est de 45 nucléotides par seconde (23).

Lorsque la molécule d'ARN a atteint une certaine taille, la sous-unité σ est relâchée du complexe et l'élongation de la chaîne d'ARN se poursuit, catalysée par le "core" de l'ARN polymérase (v. Chap. III et 9, 30, 46, 81).

L'ARN polymérase et l'ARN rendent instable localement la structure de l'ADN de T7 (6). Le complexe ARN polymérase-ADN est par contre stabilisé par la chaîne naissante d'ARN et n'est plus dissocié en présence de hautes concentrations de sel (9,56,60,71).



La synthèse d'enzymes actives à partir de l'ADN de T7 a montré que la spécificité de l'appariement complémentaire des bases de l'ARN et de l'ADN était conservée in vitro lors de l'élongation des molécules d'ARN (29,66).

4. Terminaison de la chaîne d'ARN

Le processus de la terminaison de la synthèse d'ARN peut être décomposé, en principe, en trois étapes : terminaison de l'élongation de la chaîne d'ARN, relâchement de la chaîne d'ARN et relâchement de l'ARN polymérase (20).

L'ARN polymérase d'E. coli est capable de terminer sélectivement la synthèse d'ARN à la fin de la région précoce de l'ADN de T7 avec une efficacité de 85% (54). L'extrémité 3' de cet ARN est unique et se termine par pU_{OH} (51). Des molécules d'ARN terminées sont déjà relâchées du complexe d'élongation 3 à 5 min après le début de la synthèse d'ARN (19,56). Au niveau de l'ARN polymérase, la terminaison est en général détectée indirectement en mesurant la réinitiation de la synthèse d'ARN et en démontrant que le nombre de molécules d'ARN initiées peut être supérieur au nombre de molécules d'ARN polymérase présentes dans le mélange de réaction (19). La capacité pour chaque molécule d'ARN polymérase d'initier in vitro la synthèse de plus d'une molécule d'ARN dépend de l'ADN utilisé comme matrice et de la force ionique du milieu (19,49,64). L'augmentation de l'efficacité de la réinitiation dans un milieu ayant une



force ionique élevée peut venir en partie de la diminution de l'inhibition de l'ARN polymérase par l'ARN nouvellement synthétisé (69) ou de l'augmentation de la probabilité de relâchement de l'enzyme du site de terminaison (64). La composition en sous-unités de l'ARN polymérase au moment de son relâchement de l'ADN n'est pas connue. Il est possible que la sous-unité σ se liant au "core" de l'ARN polymérase après le relâchement de la molécule d'ARN terminée, rende instable le complexe au site de terminaison et stimule ainsi le recyclage de l'enzyme (55,61,81). La fixation de la sous-unité σ sur le "core" de l'ARN polymérase après la terminaison de la synthèse d'ARN ne semble cependant pas très efficace in vitro (Bordier, observation non publiée).

Un site mineur de terminaison de la transcription précoce de l'ADN de T7, situé entre les gènes 0,3 et 0,7, est reconnu in vitro avec une efficacité de 30% (52,53). L'efficacité de la terminaison à ce site semble pouvoir être augmentée par l'addition du facteur de terminaison ρ (21). L'excès molaire observé in vivo (53,79) de l'ARN du gène 0,3 sur les autres ARN de la région précoce pourrait être dû à une terminaison prématurée de la synthèse d'ARN à la fin du gène 0,3 (voir fig. 1).



CHAPITRE III

Les résultats expérimentaux

Les résultats des recherches effectuées pendant ce travail de thèse ont fait l'objet de trois articles. Deux d'entre eux ont été publiés (7,8). Le troisième est en préparation (9). Le résumé de ces résultats est présenté dans les pages suivantes. Les résultats des paragraphes 1 et 2 de ce chapitre ont été obtenus en collaboration avec Guiseppe P. Rossetti et Jacques Dubochet, respectivement. Les deux publications (7,8) ainsi que le manuscrit (9) mentionné ci-dessus font partie du texte complet de la thèse.



1. Sous-unités de l'ARN polymérase
d'*Escherichia coli* pendant la
transcription in vitro

La composition en sous-unités de l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* a été analysée quantitativement quand l'enzyme se fixe sur l'ADN, initie la synthèse d'ARN ou allonge une chaîne d'ARN. Les complexes formés par l'ARN polymérase et l'ADN ont été sédimentés dans un gradient de glycérol et les sous-unités de l'ARN polymérase contenues dans chaque fraction du gradient ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et leur concentration a été mesurée colorimétriquement sur le gel.

Nous avons observé que l'ARN polymérase fixée sélectivement sur l'ADN en l'absence de nucléoside triphosphate a la même composition en sous-unités que l'ARN polymérase holoenzyme libre (β' , β , σ , 2α). L'addition des combinaisons de nucléosides triphosphates ATP, GTP, UTP; ATP, CTP, UTP et GTP, CTP, UTP dans le milieu de réaction contenant le complexe de fixation ne modifie pas la composition en sous-unités de l'ARN polymérase fixée sur l'ADN. Celle-ci conserve la structure de l'ARN polymérase holoenzyme. Par contre, en présence des nucléosides triphosphates ATP, GTP, CTP, jusqu'à trois picomoles de sous-unité σ peuvent être relâchées d'un complexe formé entre l'ARN polymérase et une picomole d'ADN de T7. En présence des quatre nucléosides

triphosphates, c'est-à-dire pendant l'élongation des chaînes d'ARN, environ 90% des molécules d'ARN polymérase associées à l'ADN et à l'ARN naissant ont la composition en sous-unités du "core" de l'ARN polymérase (β' , β , 2α). La sous-unité σ est relâchée du complexe d'élongation et sédimente près du sommet du gradient.

La transition entre le complexe de fixation de l'ARN polymérase holoenzyme sur l'ADN et le complexe d'élongation de la chaîne d'ARN formé avec le "core" de l'ARN polymérase a été suivi parallèlement à la cinétique d'incorporation d'ATP et de GTP à l'extrémité 5' des molécules d'ARN nouvellement synthétisées. Dans le complexe d'élongation purifié on retrouve environ une picomole d'ATP ou de GTP incorporée dans de l'ARN par picomole du "core" de l'ARN polymérase engagé dans l'élongation de la molécule d'ARN. La fraction d'ARN polymérase retrouvée dans le complexe d'élongation permet une estimation précise de la fraction d'ARN polymérase active présente dans la préparation d'enzyme.

2. Localisation au microscope électronique des sites de fixation de l'ARN polymérase d'Escherichia coli dans la région du promoteur de la transcription précoce du bactériophage T7.

L'ARN polymérase holoenzyme d'Escherichia coli fixée sur l'ADN de T7 a été étudiée au microscope électronique. En observant en fond noir des spécimens préparés par adhésion sur des films chargés positivement, nous avons localisé les sites de fixation de l'ARN polymérase sur la carte physique de l'ADN de T7.

A un rapport molaire ARN polymérase/ADN inférieur à 10 nous avons trouvé trois forts sites de fixation à 1.15, 1.41 et 1.65 unités physiques. Ces sites sont localisés dans la région du promoteur de la transcription précoce et sont probablement identiques aux trois sites d'initiation de la synthèse d'ARN trouvés par d'autres chercheurs dans cette région. A des rapports enzyme/ADN plus élevés d'autres sites de fixation sont occupés par l'ARN polymérase, deux d'entre eux ont été localisés à 0.6 et 3.3 unités physiques.

La fixation de l'ARN polymérase en présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN a été étudiée de la même manière. La rifampicine et l'héparine ont été incubées soit avec l'ARN polymérase libre soit avec le complexe de fixation ARN polymérase-ADN. L'inactivation de l'ARN polymérase par la rifampicine n'a eu d'effet ni sur la formation ni sur la stabilité des complexes de fixation. L'ARN polymérase libre inactivée par l'héparine n'est

pas capable de former des complexes de fixation avec l'ADN tandis que l'addition d'héparine après la formation des complexes n'a pas d'effet sur les enzymes fixées sélectivement. Les inhibiteurs interagissant avec l'ADN ont été incubés avec celui-ci avant l'addition d'ARN polymérase. L'ADN préincubé en présence d'actinomycine D garde sa capacité de fixer sélectivement les molécules d'ARN polymérase tandis que l'ADN préincubé en présence de bromure d'éthidium ne forme pas de complexe de fixation.

3. Inhibition de la synthèse d'ARN résistante à la rifampicine par des complexes rifampicine-ARN polymérase

Un complexe de fixation a été formé entre l'ADN de T7 et l'ARN polymérase d'Escherichia coli du type sauvage inactivée par la rifampicine. Ce complexe a été utilisé comme matrice pour une synthèse d'ARN in vitro. La synthèse d'ARN en présence de rifampicine a été catalysée par l'ARN polymérase d'E. coli résistante à la rifampicine ou par l'ARN polymérase du bactériophage T7. Le résultat de ces expériences montre que l'ARN polymérase d'E. coli inactivée par la rifampicine inhibe la synthèse d'ARN spécifique catalysée par l'enzyme d'E. coli résistante à la rifampicine mais n'a pas d'effet sur l'activité de l'ARN polymérase du bactériophage T7. Cette inhibition est due à la formation de complexes stables entre la rifampicine, l'ARN polymérase d'E. coli du type sauvage et les sites de fixation du promoteur de la transcription précoce. Ces complexes bloquent l'accès au promoteur de la transcription précoce pour l'ARN polymérase d'E. coli résistante à la rifampicine mais sont sans effet sur la reconnaissance des promoteurs de la transcription tardive par l'ARN polymérase du bactériophage T7.

LITTERATURE CITEE

1. Allet, B., Roberts, R.J., Gesteland, R.F., Solem, R.
(1974). Nature, 249, 217-221.
2. Antony, D.D., Goldthwait, D.A. (1970). Biochim. Biophys.
Acta, 204, 156-167.
3. Bautz, E.K.F., Bautz, F., Dunn, J. (1959). Nature, 223,
1022-1024.
4. Berg, D., Chamberlin, M. (1970). Biochemistry, 9,
5055-5064.
5. Berg, D., Barrett, K., Chamberlin, M. (1971). Methods
in Enzymology, 21, 506-519.
6. Bick, M.D., Lee, C.S., Thomas, C.A.Jr. (1972). J. Mol.
Biol., 71, 1-9.
7. Bordier, C. (1974). FEBS Letters, 45, 259-262.
8. Bordier, C., Dubochet, J. (1974). Eur. J. Biochem.,
44, 617-624.
9. Bordier, C., Rossetti, G.P. Manuscrit en préparation.
10. Brautigam, A.R., Sauerbier, W. (1973). J. Virol. 12,
882-886.
11. Brautigam, A.R., Sauerbier, W. (1974). J. Virol. 13,
1110-1117.
12. Burgess, R.R. (1969). J. Biol. Chem., 244, 6160-6167.
13. Burgess, R.R. (1969). J. Biol. Chem., 244, 6168-6176.
14. Burgess, R.R., Travers, A., Dunn, J., Bautz, E. (1969).
Nature 221, 43-46.
15. Burgess, R.R. (1971). Ann. Rev. of Biochemistry, 40,
711-740.
16. Burgess, R.R., Travers, A.A. (1971). Methods in
Enzymology, 21, 500-506.

17. Chamberlin, M., Berg, P. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci., USA 48, 81-94.
18. Chamberlin, M., Mc Grath, J., Waskell, L. (1970). Nature, 228, 227-231.
19. Chamberlin, M.J., Ring, J. (1972). J. Mol. Biol. 70, 221-237.
20. Chamberlin, M.J. (1974). Ann. Rev. of Biochemistry, 43, 721-775.
21. Darlix, J.L. (1974). Biochimie, 56, 693-701.
22. Dausse, J.P., Sentenac, A., Fromageot, P. (1972). Eur. J. Biochem., 26, 43-49.
23. Davis, R.W., Hyman, R.W. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 269-281.
24. Delius, H., Westphal, H., Axelrod, N. (1973). J. Mol. Biol. 74, 677-687.
25. Dunn, J.J., Studier, F.W. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., USA 70, 1559-1563.
26. Dunn, J.J., Studier, F.W. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., USA 70, 3296-3300.
27. Freifelder, D. (1970). J. Mol. Biol. 54, 567-577.
28. Fukuda, R., Ishihama, A. (1974). J. Mol. Biol. 87, 523-540.
29. Gelfand, D.M., Hayashi, M. (1970). Nature, 228, 1162-1165.
30. Gerard, G.F., Johnson, J.C., Boezi, J.A. (1972). Biochemistry, 11, 989-997.
31. Golomb, M., Chamberlin, M. (1974). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 71, 760-764.
32. Gomez, B., Lang, D. (1972). J. Mol. Biol., 70, 239-251.
33. Harford, A.G., Beer, M. (1972). J. Mol. Biol., 69, 179-186.

34. Heil, A., Zillig, W. (1970). FEBS Letters, 11, 165-168.
35. Hinkle, D.C., Chamberlin, M. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 65-72.
36. Hinkle, D.C., Chamberlin, M. (1972). J. Mol. Biol., 70, 157-185.
37. Hinkle, D.C., Chamberlin, M. (1972). J. Mol. Biol., 70, 187-195.
38. Hinkle, D.C., Mangel, W.F., Chamberlin, M. (1972). J. Mol. Biol., 70, 209-220.
39. Hyman, R.W. (1971). J. Mol. Biol., 61, 369-376.
40. Iida, Y., Matsukage, A. (1974). Molec. gen. Genetics, 129, 27-35.
41. Ishihama, A., Murakami, S., Fukuda, R., Matsukage, A., Kameyama, T. (1971). Molec. gen. Genetics, 111, 66-76.
42. Ishihama, A. (1972). Biochemistry, 11, 1250-1258.
43. Ishihama, A., Ito, K. (1972). J. Mol. Biol., 72, 111-123.
44. Ishihama, A., Fukuda, R., Ito, K. (1973). J. Mol. Biol., 79, 127-136.
45. Ito, K., Ishihama, A. (1973). J. Mol. Biol. 79, 115-125
46. Krakow, J.S., von der Helm, K. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 73-83.
47. Kramer, R.A., Rosenberg, M., Steitz, J.A. Communication personnelle.
48. Le Talaer, J.Y., Kermici, M., Jeanteur, P. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 70, 2911-2915.
49. Maitra, U., Lockwood, A.M., Dubnoff, J.S., Guha, A. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 143-156.

50. Matsukage, A. (1972). Molec. gen. Genetics, 118, 23-31.
51. Millette, R.L., Trotter, C.D., Herrlich, P., Schweiger, M. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 25, 135-142.
52. Minkley, E., Pribnow, D. (1973). J. Mol. Biol., 77, 255-277.
53. Minkley, E. (1974). J. Mol. Biol., 83, 289-304.
54. Minkley, E. (1974). J. Mol. Biol., 83, 305-331.
55. Mueller, K. (1971). Molec. gen. Genetics, 111, 273-296.
56. Naito, S., Ishihama, A. (1973). Biochem. Biophys. res. comm., 51, 323-330.
57. Portmann, R., Sogo, J.M., Koller, T., Zillig, W. (1974). FEBS Letters, 45, 64-67.
58. Richardson, J.P. (1966). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 55, 1616-1623.
59. Richardson, J.P. (1966). J. Mol. Biol., 21, 83-113.
60. Richardson, J.P. (1966). J. Mol. Biol., 21, 115-127.
61. Richardson, J.P. (1970). Nature, 225, 1109.
62. Richtie, D.A., Thomas, Jr.C.A., Mc Hattie, L.A., Wensink, P.C. (1967). J. Mol. Biol., 23, 365-376.
63. Rosenberg, M., Kramer, R.A., Steitz, J.A. Communication personnelle.
64. Schaefer, R., Zillig, W. (1973). Eur. J. Biochem., 33, 215-226.
65. Schaefer, R., Kraemer, R. Zillig, W., Cudny, H. (1973). Eur. J. Biochem., 40, 367-373.
66. Schweiger, M., Herrlich, P., Millette, R.L. (1971). J. Biol. Chem. 246, 6707-6712.
67. Siegel, R.B., Summers, W.C. (1970). J. Mol. Biol., 49, 115-123.

68. Simon, M.N., Studier, F.W. (1973). J. Mol. Biol., 79, 249-265.
69. So, A.G., Davie, E.W., Epstein, R., Tissières, A. (1967). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 58, 1739-1746.
70. Stevens, A. (1969). J. Cellular Physiology, 74, Sup. 1, 205-218.
71. Stonington, O.G., Pettijohn, D.E. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 68, 6-9.
72. Studier, F.W. (1965). J. Mol. Biol., 11, 373-390.
73. Studier, F.W. (1969). Virology, 39, 562-574.
74. Studier, F.W. (1972). Science, 176, 367-376.
75. Studier, F.W. (1973). J. Mol. Biol., 79, 227-236.
76. Studier, F.W. (1973). J. Mol. Biol., 79, 237-248.
77. Sugiura, M., Okamoto, T., Takanami, M. (1970). Nature, 225, 598-600.
78. Summers, W.C., Szybalski, W. (1968). Virology, 34, 9-16.
79. Summers, W.C. (1972). Ann. Rev. Genetics, 6, 191-202.
80. Summers, W.C., Brunovskis, I., Hyman, R.W. (1973). J. Mol. Biol., 74, 291-300.
81. Travers, A.A., Burgess, R.R. (1969). Nature, 222, 537-540.
82. Vogt, V. (1969). Nature, 223, 854-855.

